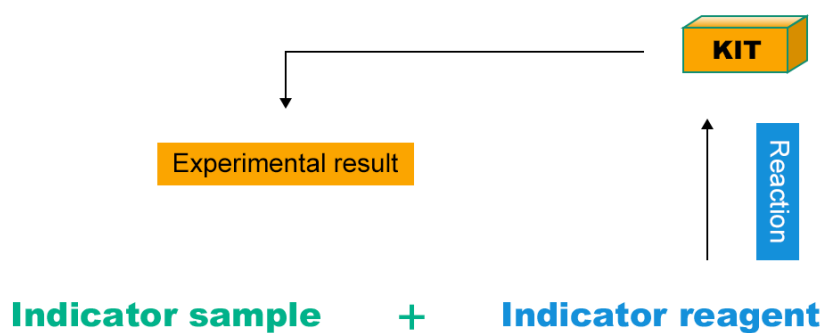


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0672

Size: 50T/48S

丙酮酸激酶 (PK) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

PK (EC 2.7.1.40) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 催化糖酵解过程中的最后一步反应, 是糖酵解过程中的主要限速酶之一, 也是产 ATP 的关键酶之一, 因此测定 PK 活性具有重要意义。

二、测定原理:

PK 催化磷酸烯醇式丙酮酸和 ADP 生成 ATP 和丙酮酸, 乳酸脱氢酶进一步催化 NADH 和丙酮酸生成乳酸和 NAD^+ , 在 340nm 下测定 NADH 下降速率, 即可反映 PK 活性。

三、需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	60mL × 1 瓶	4℃ 保存	—
试剂一	液体 45mL × 1 瓶	4℃ 保存	—
试剂二	粉剂 × 1 支	-20℃ 保存	—
试剂三	粉剂 × 1 支	-20℃ 保存	临用前加入 1.5mL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂 4℃ 保存一周;
试剂四	液体 × 1 支	4℃ 保存	临用前加入 900 μL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂 4℃ 保存一周;

五、样本的前处理

- 1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 2、组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 3、血清（浆）样品：直接检测。

六、测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2、工作液的配制：临用前将试剂二转移至试剂一中，充分溶解待用；现配现用；
- 3、将工作液、试剂三和试剂四 37℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种)预热 10 分钟。
- 4、加样表：

试剂名称(μL)	测定管
工作液	900
试剂三	30
试剂四	15
样本	30

将上述试剂按顺序加入 1mL 石英比色皿中，立即混匀，加样本的同时开始计时，340nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1 和 2 分 20 秒时的吸光度 A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

七、PK 活性计算

1、血清（浆）中 PK 活力的计算：

单位的定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PK (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 2613 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 PK 活力的计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PK (nmol/min /mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 2613 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PK (nmol/min /g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 2613 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PK (nmol/min /10}^4\text{cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 5.226 \times \Delta A \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积， 9.75×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；

d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.03 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。